



TITLE:

Fraction of MHCII and EpCAM expression characterizes distal lung epithelial cells for alveolar type 2 cell isolation( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Hasegawa, Kouichi

---

CITATION:

Hasegawa, Kouichi. Fraction of MHCII and EpCAM expression characterizes distal lung epithelial cells for alveolar type 2 cell isolation. 京都大学, 2018, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2018-03-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21000>

RIGHT:

京都大学	博士（医 学）	氏 名	長谷川 浩一
論文題目	Fraction of MHCII and EpCAM expression characterizes distal lung epithelial cells for alveolar type 2 cell isolation (MHCII と EpCAM の発現解析による 2 型肺胞上皮細胞の高純度単離法の確立)		
(論文内容の要旨)			
【背景】			
肺は生体におけるガス交換の場で多様な細胞により構成される．気道系の最末梢は肺胞となり，ガス交換に寄与する扁平な 1 型肺胞上皮細胞（Alveolar type 1 cell: AT1）と，立方状の 2 型肺胞上皮細胞（AT2）により内面が覆われる．AT2 はサーファクタントを産生し肺胞虚脱を抑制するほか，組織幹細胞として増殖し，AT1 への分化により肺胞上皮の恒常性を維持する．このような AT2 の機能は肺から単離した AT2 を用いて明らかにされてきたが，従来の AT2 単離法は気道系上皮細胞や AT1，また非上皮細胞の混入により，純度が十分ではなかった．高純度 AT2 の単離は AT2 特異的な機能の解析に必須であり，これにより肺胞における恒常性維持機構がさらに明らかになると期待される．			
Major histocompatibility complex class II (MHCII)は，主に免疫系の抗原提示細胞に発現するが，AT2 においても発現していることが過去に報告されている．本研究では AT2 における MHCII の発現に着目し，AT2 とその他の肺上皮細胞を分別することで，高純度 AT2 単離法を確立することを目的とした．			
【方法】			
マウス肺構成細胞をタンパク分解酵素処理により単細胞化した．蛍光抗体により各種表面抗原（CD45/ CD31/ Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)/ MHCII）と AT2 特異的な細胞内マーカーである pro-surfactant protein C (proSP-C)を標識し，AT2 (proSP-C 陽性細胞)における表面抗原の発現をフローサイトメトリーで解析した．その結果をもとに AT2 を単離し，その純度 (proSP-C 陽性率)を蛍光免疫染色とフローサイトメトリーを用いて評価した．本研究において新しく確立した AT2 単離法を，異なる系統や週齢のマウス，さらに肺傷害モデルを用いて検証した．			
【結果】			
マウス肺組織の蛍光免疫染色において，MHCII の AT2 への発現が確認された．フローサイトメトリーを用いた EpCAM, MHCII, proSP-C の発現解析において，肺上皮細胞は 3 群，すなわち EpCAM <sup>med</sup> MHCII <sup>+</sup> 細胞，EpCAM <sup>hi</sup> MHCII <sup>-</sup> 細胞，EpCAM <sup>low</sup> MHCII <sup>-</sup> 細胞に分類され，proSP-C 陽性 AT2 は EpCAM <sup>med</sup> MHCII <sup>+</sup> 細胞に集積していることが示された．			
フローサイトメトリーを用いて単離した EpCAM <sup>med</sup> MHCII <sup>+</sup> 細胞における AT2 の純度は，蛍光免疫染色による評価で 99.0%，フローサイトメトリーによる評価で 98.0%であり，従来の MHCII を用いない方法と比較し有意に高純度であった．また EpCAM <sup>hi</sup> MHCII <sup>-</sup> 細胞は主に線毛細胞で，EpCAM <sup>low</sup> MHCII <sup>-</sup> 細胞は AT1 が主体であることが免疫染色と遺伝子発現解析により明らかとなった．肺上皮細胞におけ			

る EpCAM と MHCII の発現様式は，異なる系統や週齢のマウス，またリポポリサッカライド誘導肺傷害モデルにおいても変化がみられなかった．
【結語】
肺上皮細胞は EpCAM と MHCII の発現強度により 3 群に分別され，フローサイトメトリーを用いたこれら表面抗原の発現解析により，従来法と比較しより高純度な AT2 を単離する方法を確立した．本方法を用いることで，AT2 による肺胞恒常性維持における，より正確で新しい知見を得ることができると期待される．
（論文審査の結果の要旨）
2 型肺胞上皮細胞(AT2)は、ガス交換の場である肺胞領域の恒常性維持に重要な役割を果たしているが、そのメカニズムは十分明らかにされていない。肺が多種の細胞で構成され、全肺での解析では AT2 特異的な情報を得ることが困難であるためである。AT2 を肺から単離し解析することも試みられてきたが、AT2 特異的な表面抗原の欠如により高純度な AT2 を得ることが難しかった。本研究では AT2 における MHCII の発現に着目し、それを表面抗原として用いた AT2 単離法の確立を目指した。
肺単細胞浮遊液の FACS を用いた定量解析により、ほぼ全ての AT2 は MHCII を発現しているのに対し、その他の肺上皮細胞は大半が発現していないことを明らかにした。また、従来の上皮細胞マーカーである EpCAM と、MHCII の発現解析を組み合わせ、肺上皮細胞が 3 つに分画できることを明らかにした。AT2 が集積する分画(EpCAM <sup>med</sup> MHCII <sup>+</sup> )を FACS にて単離し、純度 98-99%という高純度の AT2 を得ることが可能となった。さらに、新たに確立した AT2 単離法を、各週齢や系統のマウス、急性肺傷害モデルの解析へも適応できることを明らかにした。
以上の研究は様々な病態モデルの解析における高純度 AT2 細胞の単離に貢献し、今後の AT2 による肺胞恒常性維持機構の解明に寄与するところが多い。
したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。
なお、本学位授与申請者は、平成 30 年 2 月 14 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。